Omaggio dell'A.

Estratto dall'Archivio di Fisiologia

Vol. XIV. - Fasc. II. - Gennaio 1916

IX.

LA COSTITUZIONE DEL PROTOPLASMA STUDIATA SU CELLULE VIVENTI COLTIVATE « IN VITRO ».

GIUSEPPE LEVI.

[Dall'Istituto Anatomico di Palermo].

IX.

LA COSTITUZIONE DEL PROTOPLASMA STUDIATA SU CELLULE VIVENTI COLTIVATE « IN VITRO ».

GIUSEPPE LEVI.

(Con due figure intercalate nel testo).

(Dall'Istituto Anatomico di Palermo)

Le ricerche citologiche degli ultimi anni hanno riaperta la discussione, da parecchio tempo sopita, sovra un problema che appassionò i grandi istologi della fine del secolo scorso, quello della costituzione del protoplasma.

Gli studî di ALTMANN, di BENDA, di MEVES, di DUESBERG e di molti altri hanno dimostrato, che in tutte le cellule animali e vegetali sono contenuti degli organuli, dotati di proprietà fisiche particolari, i quali persistono durante tutta la vita della cellula e sono trasmessi alla generazione successiva — i condriosomi di MEVES o mitocondri di BENDA.

Però tali studî, per quanto condotti con serietà e con rigore di metodo, furono da qualche citologo accolti con diffidenza, e da altri vivacemente criticati; GURWITCH e RETZIUS arrivano a negare qualsiasi valore alla moderna teoria del condrioma.

Chiunque si sia dato la pena di studiare senza preconcetti il condrioma in elementi di varia natura e con procedimenti tecnici diversi, non può a meno di ritenere ingiusto uno scetticismo tanto spinto; ma non può d'altra parte nascondersi che in tale capitolo della citologia vi sono ancora molti, forse troppi punti oscuri e lacune; questo perchè, salvo in qualche caso favorevole, i condriosomi riescono accessibili all'indagine soltanto in preparati fissati e sottoposti a complicati processi di colorazione.

Nelle cellule viventi, sebbene i condriosomi siano dotati di una refrangenza di gran lunga maggiore del rimanente citoplasma, per lo spessore relativamente grande che hanno anche le più piccole cellule, essi negli elementi dissociati e conservati in liquidi isotonici nella loro integrità, vengono a trovarsi sovrapposti in varî piani, e perciò di rado sono otticamente differenziabili.

Solamente in condizioni particolarmente favorevoli, che è superfluo riferire qui, questa dimostrazione è possibile; FLEMMING per il primo dimostrò in cellule viventi dei filamenti, che ricerche successive permi-

sero di ricondurre nel gruppo degli organuli condriosomici; più recentemente TERNI, MAXIMOW, GUILLERMOD, PENSA, eseguirono osservazioni analoghe in varî elementi viventi animali e vegetali.

Però le cellule fin qui studiate, sia perchè artificialmente dissociate, sia per altre ragioni, avevano una vitalità limitata, dimodochè non era possibile di seguire le trasformazioni che il protoplasma subisce nelle varie fasi della sua attività biologica.

Per lo studio dei condriosomi del vivente ho ricorso ad un procedimento diverso da quello finora seguito. È noto che il metodo delle colture dei tessuti in vitro scoperto da HARRISON ed ulteriormente svolto da BURROW, da CARREL e da LEWIS, permette di mantenere in vita per lungo tempo nella linfa od in plasma sanguigno, od anche in mezzi artificiali di coltura delle cellule di embrioni o di organismi adulti, e di studiare sotto il microscopio le trasformazioni che questi tessuti subiscono.

Io ho trovato che questo metodo, quando sia adoperato con accorgimenti speciali, si presta mirabilmente allo studio di problemi citologici. L'inconveniente che maggiormente ostacola l'osservazione delle cellule viventi, al quale accennai più sopra, lo spessore notevole del corpo cellulare, viene ad essere col metodo delle colture del tutto eliminato.

Le cellule emigrate dal pezzo trapiantato nel plasma, se si ha cura di distendere sul coprioggetti il plasma ancora liquido in uno strato assai tenue, si appiattiscono a tale punto, che diventano delle lamine di estrema sottigliezza, dimodochè l'analisi dell' intima costituzione del protoplasma viene grandemente facilitata.

La coltura viene esaminata al microscopio, dopo avere racchiuso quest' ultimo in un termostato PFEIFFER alla temperatura di 39°, nel quale la coltura può essere mantenuta per parecchi giorni; è opportuno di ricorrere, per ragioni ovvie, ad obiettivi a distanza focale non troppo breve; l'apocromatico ad immersione di ZEISS di 3 mm. corrisponde perfettamente. Le osservazioni vennero eseguite con luce artificiale senza condensatore; solamente nell'esame delle colture con colorazioni vitali l'illuminazione col condensatore riesce vantaggiosa.

Condizione necessaria adunque per queste osservazioni, è che il coagulo di plasma sia disteso sul coprioggetti in uno strato estremamente sottile; in tal caso le cellule si spingono fra la faccia inferiore del coprioggetti ed il tenuissimo coagulo, il quale più tardi verrà in parte digerito e perciò ulteriormente assottigliato, per opera dei fermenti prodotti dalle cellule.

Le mie osservazioni furono condotte su colture di tessuti diversi di embrioni di pollo dal 2° al 18° giorno d'incubazione; le colture furono

quasi sempre eseguite in plasma omogeneo; risultati di gran lunga meno favorevoli ottenni col metodo di aggiungere semplicemente una minima quantità di liquido di RINGER.

In questa comunicazione verrà riferito soltanto sulla costituzione delle cellule mesenchimali del cuore e del tegumento; ma non è inutile che io rammenti, che strutture analoghe furono da me osservate in cellule dell' ectoderma tegumentario, dell'epitelio intestinale ed in molte altre; e da ricerche che vengono eseguite da LUNA nel nostro Istituto risulta, che anche le cellule dell'epitelio pigmentato della retina si prestano molto bene per l'analisi citologica.

Degli speciali accorgimenti tecnici da me eseguiti, destinati a facilitare lo studio delle cellule coltivate viventi ed a fissarle ed a colorirle in modo adatto sarà detto in altra pubblicazione. Desidero però di rilevare fin d'ora quale interesse abbia per la citologia la possibilità offertaci da questo metodo di studiare le modificazioni indotte dalla fissazione in una determinata cellula, che fu analizzata per lungo tempo vivente; e quanto sia vantaggioso l'eliminare gli inconvenienti dell' inclusione e delle sezioni col rasoio.

Le cellule mesenchimali coltivate in plasma si presentano a forma variabile; affusate, stellate, triangolari, con numerosi prolungamenti, spesso ramificati.

La forma della cellula dipende da varî fattori non sempre esattamente determinabili, pur essendo eguale la quantità di plasma. Anzi tutto il tessuto dal quale la cellula proviene; ho notato ad esempio, che mentre le cellule mesenchimali del miocardio e del tegumento e dei miotomi hanno prevalentemente la forma di lamelle con tozzi prolungamenti, le cellule mesenchimali dei ganglî spinali emettono prolungamenti sottili, non di rado estremamente lunghi.

Le varie cellule sono talora isolate, altre volte riunite in scincizi; anche i singoli punti di una stessa coltura presentano diversità notevolissime. La cellula acquista una forma lamellare soltanto dopo 14-20 ore di permanenza della coltura nel termostato. Invece le colture di 3-10 ore di vita sono meno adatte per tali osservazioni; in queste le cellule più periferiche emettono prolungamenti lunghi, filiformi e ramificati; più tardi fa capolino un cappuccio di citoplasma, poi il nucleo, e soltanto più tardi la cellula diviene visibile nella sua totalità.

Poche parole sul nucleo; questo si presenta in forma di una grossa vescicola, sferica od ovale; una forma molto allungata ha il nucleo nelle cellule più spiccatamente affusate; il contenuto nucleare delle cellule in riposo è otticamente omogeneo, ed il suo indice di refrazione non è molto

diverso da quello del citoplasma; contiene una o due masse molto refrangenti, che corrispondono a quelli che vengono comunemente chiamati nucleoli, sferiche od ovali od a forma irregolare; in una cellula la forma dei nucleoli cambia continuamente; si disgregano in granuli per poi ricostituirsi in una massa compatta, oppure emettono dei prolungamenti.

Nel citoplasma si distingue una parte fondamentale poco refrangente a costituzione perfettamente omogenea; neppure coi mezzi ottici più potenti riescii a distinguere in questa parte del citoplasma, che è di gran lunga la prevalente, una struttura qualsiasi; la differenza nell'indice di refrazione fra il citoplasma ed il plasma circostante non è molto elevata, tanto che il contorno cellulare non si distingue affatto nelle colture fortemente illuminate col condensatore.

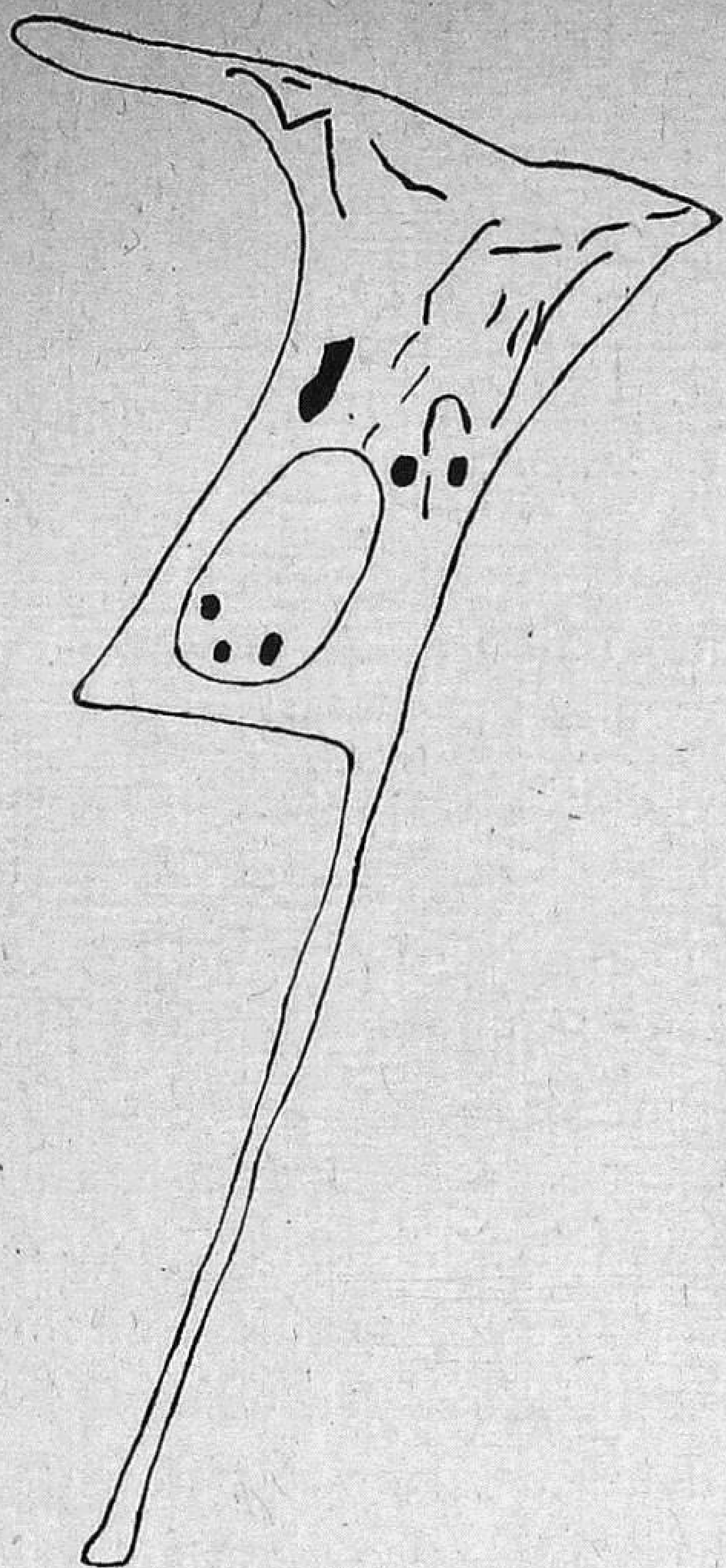
È evidente che la refrangenza del citoplasma è direttamente proporzionale al suo spessore; è relativamente rilevante nella parte contigua al nucleo, ove la lamina protoplasmica è meno assottigliata, va diminuendo verso la parte distale dei prolungamenti ameboidi, ove il citoplasma è in forma di una lamina tenue. Le condizioni suddette rendono spesso difficilmente apprezzabili i limiti dell'estremo distale finamente ramificato del prolungamento.

In questa parte omogenea del citoplasma sono sospesi gli organuli cellulari in forma di filamenti e di granulazioni di vario volume; gli uni e gli altri sono in continuo movimento; i filamenti, che definiremo senz'altro come condrioconti, ed i grossi granuli si spostano lentamente, con rapidità maggiore i granuli più minuti.

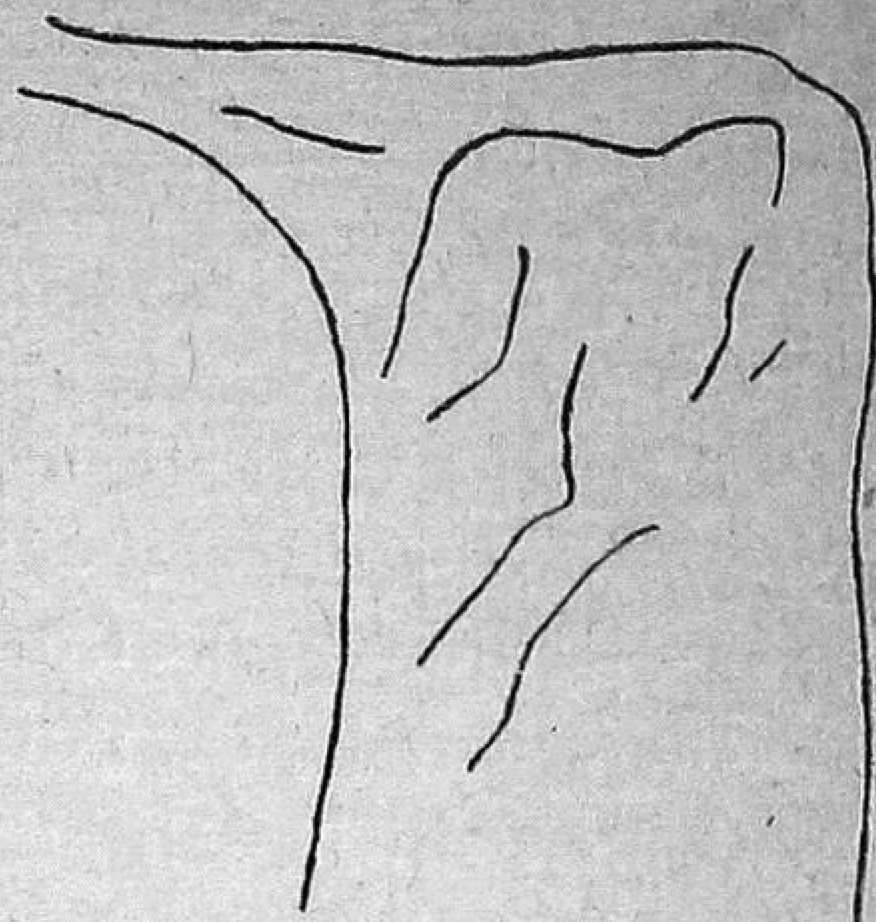
Gli uni e gli altri si differenziano otticamente dal citoplasma nel quale sono immersi per il loro indice di refrazione più elevato, tanto nettamente, che si riesce agevolmente a determinarne il numero ed a riprodurli coll'apparecchio da disegno; e la sola difficoltà che ne ostacola la riproduzione con quel mezzo, è il continuo spostamento ed i mutamenti di forma che essi subiscono.

Esaminando una stessa cellula a brevi intervalli, anche di frazioni di minuto, apprezziamo un mutamento nella sede dei singoli filamenti e contemporaneamente la loro forma si modifica; alcuni si allungano e si assottigliano, altri si accorciano e divengono più tozzi; ed il cambiamento di forma è accompagnato da un aumento nella loro refrangenza, il che fa supporre che non soltanto la forma, ma anche lo stato fisico sia mutato.

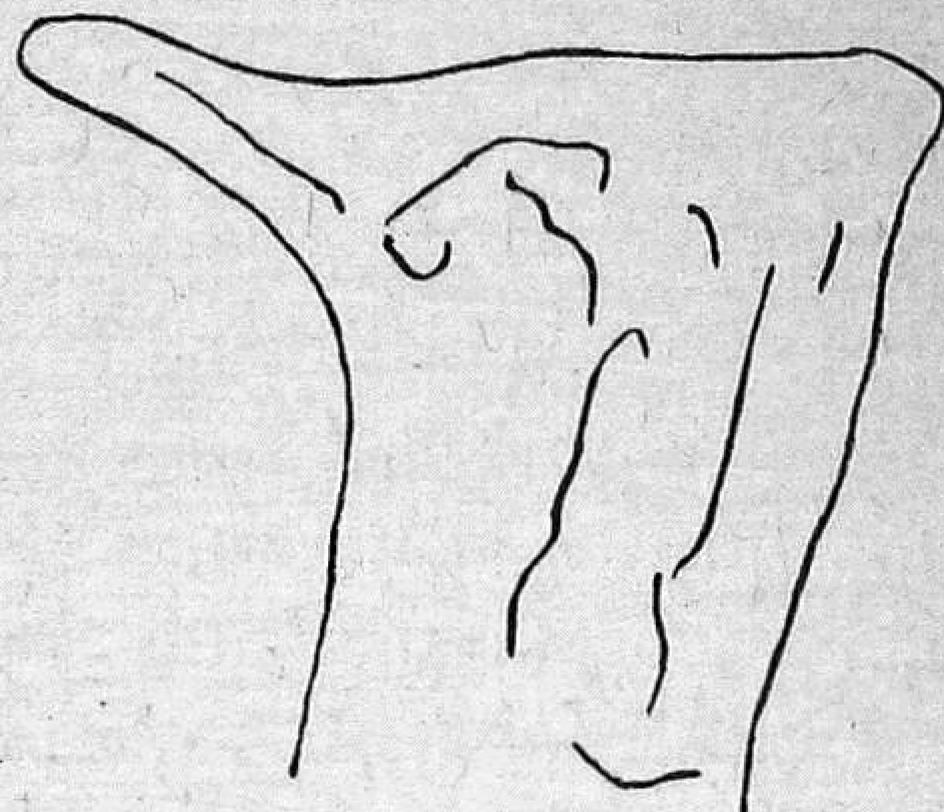
Oppure corti bastoncini si riuniscono con rapidità sorprendente in serie, costituendo un lungo filamento; questo avviene di solito nelle cellule provviste di lunghi prolungamenti.



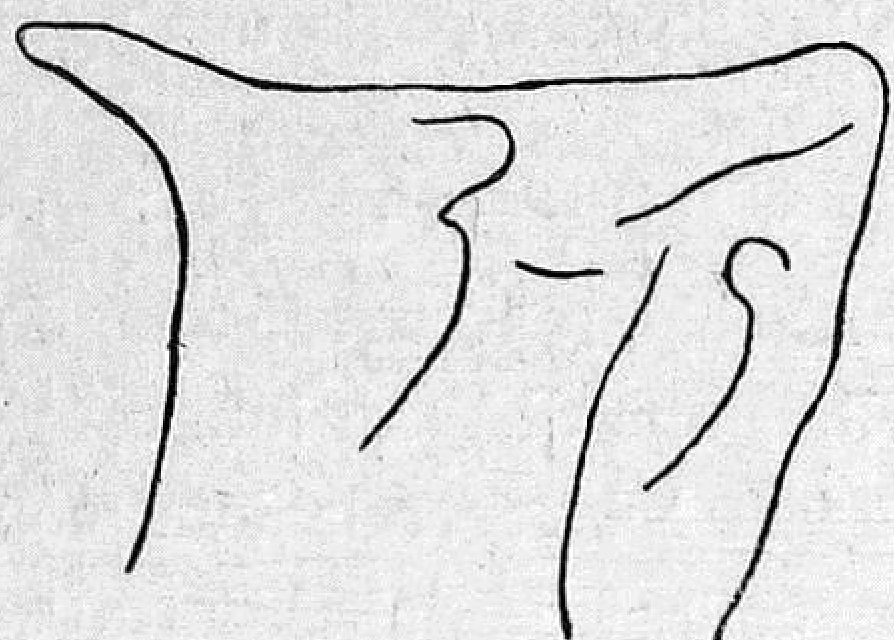
a - ore 11,55.



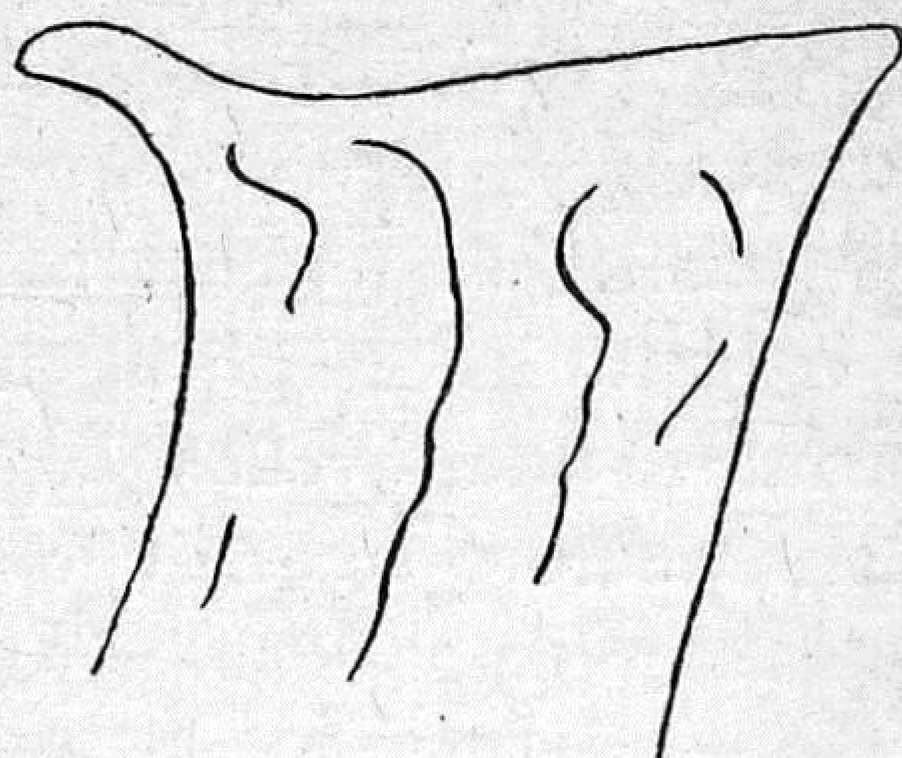
b - ore 12.



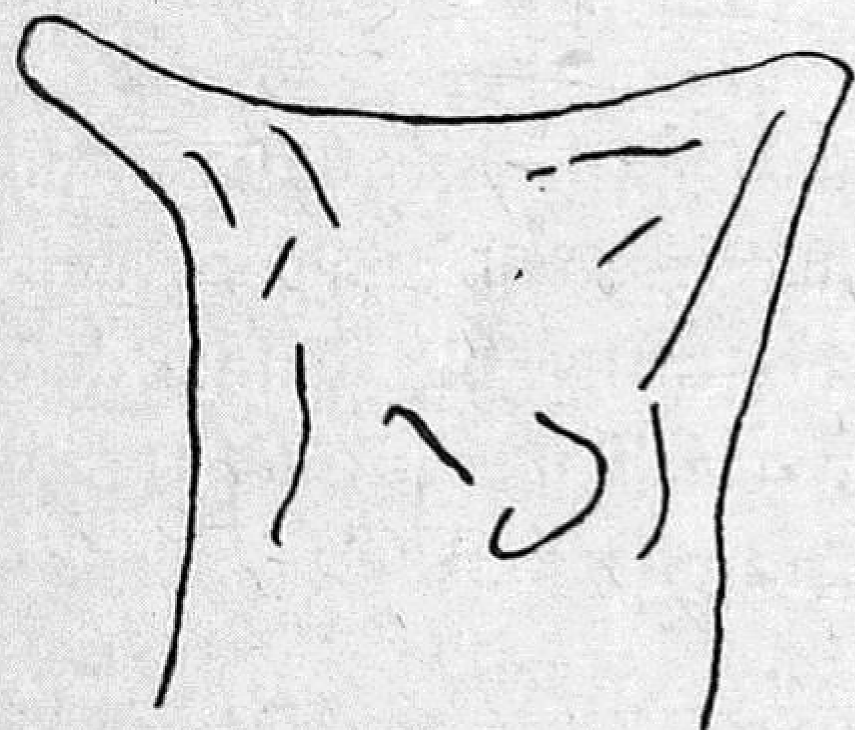
c - ore 12,10.



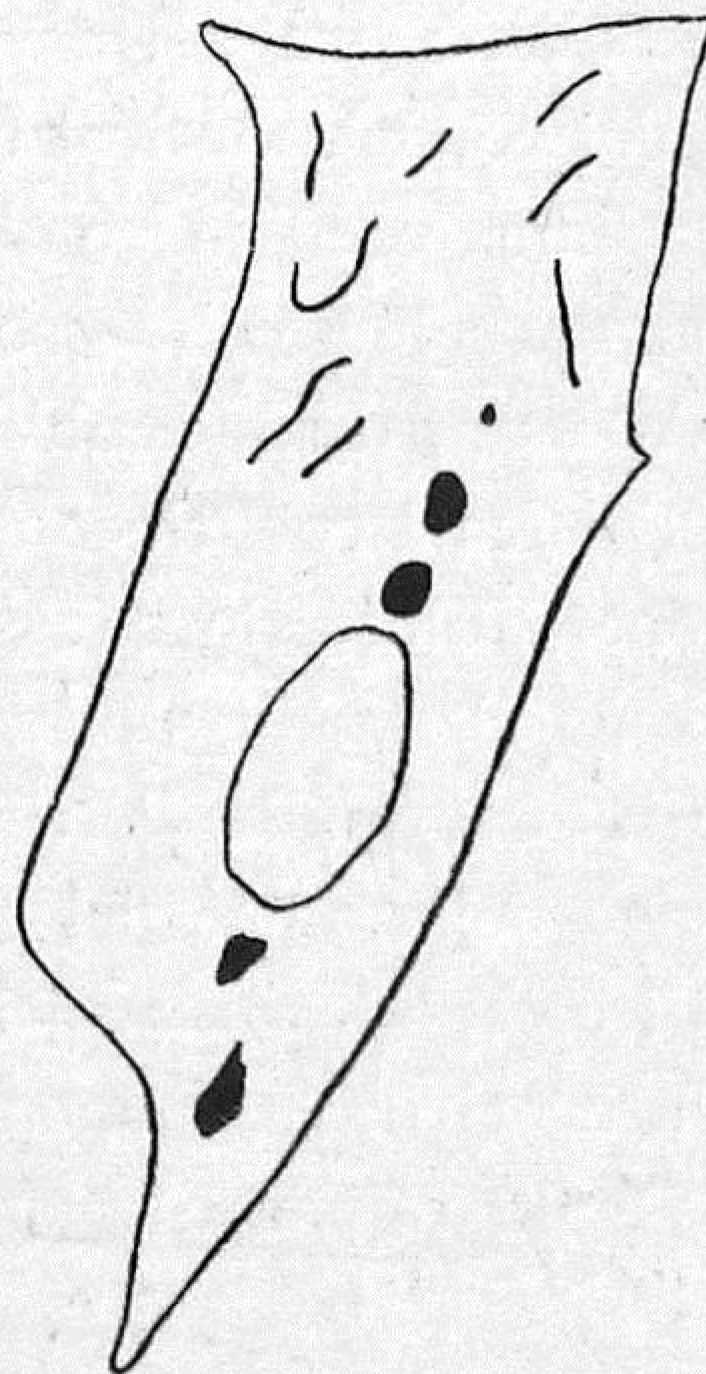
d - ore 12,17.



e - ore 12,22.



f - ore 12,27.



g - ore 14.

Fig. 1. - *a*, *b*, *c*, *d*, *e*, *f*, *g*. - Riproduzione delle modificazioni del condrioma di una stessa cellula esaminata vivente in una coltura di 50 ore di miocardio di embrione di pollo di 6 giorni e mezzo. Imm. apocr. Zeiss. mm 3, Oc. 8.

Nella fig. 1 (a-g) ho riprodotto i mutamenti osservati nel condrioma, a brevi intervalli di tempo, in una cellula mesenchimale di una coltura di 50 ore di miocardio di embrione di pollo di 6 giorni e mezzo.

Nelle cellule espanse in lunghi prolungamenti ho notato la riunione di molti filamenti in serie lineare; ne risulta un unico lunghissimo condrioconto, il quale tosto si frammenta di nuovo in varî segmenti; e questi dopo breve tempo si ricostituiscono in una nuova unità. Sovente ho notato l' incurvamento di filamenti in anse od in anelli, che ben presto si raddrizzano. Talora due filamenti si accollano anzichè in serie lineare a V od a T, e nel punto di congiunzione si nota un ispessimento; ma il fenomeno è fugace ed i due filamenti tosto si liberano.

Tali spostamenti dei condrioconti sono certamente correlativi al movimento ameboide della cellula; quanto più attivo è il movimento, tanto più vivace è il cambiamento di sede e di forma dei filamenti. Con ciò non intendo di affermare che si tratti di spostamenti passivi, ed anzi io trassi dalle mie ricerche la convinzione, che i filamenti siano dotati di un certo grado di contrattilità; se essi non possedessero tale proprietà non mi saprei spiegare i mutamenti nella loro forma. E d'altro canto anche in cellule nelle quali i movimenti ameboidi sono estremamente lenti, quali quelle dell'ectoderma tegumentario di embrioni di pollo, ho osservato analoghi mutamenti nella forma e nella sede del condrioma.

Mentre i filamenti di cui ci siamo finora occupati sono un attributo costante di tutte le cellule, le granulazioni possono anche mancare, e quando esistono offrono una costanza di tipo e di distribuzione di gran lunga minore di fronte ai filamenti; variabilità che in parte è in correlazione con altri caratteri morfologici della cellula, in parte colla fase della sua attività biologica.

Diciamo ora dei caratteri fisici delle granulazioni; son più refrangenti dei condrioconti, il che permette di distinguerle anche ad un medio ingrandimento ed in condizioni meno favorevoli di illuminazione; hanno differente volume; spesso sono minutissime ed in tal caso caratterizzate da una grande mobilità; si spostano rapidamente insinuandosi negli interstizî fra i condrioconti, quasi fossero mosse da un movimento di propulsione. Talora dopo essersi spinte sin quasi ad un'estremità della cellula sono ricacciate di nuovo verso il punto di partenza.

In quanto alla distribuzione rispettiva dei filamenti e granuli, ho notato che nella parte del citoplasma che si trova presso il nucleo prevalgono i corti filamenti ed i granuli, mentre che nel tratto più distale della cellula e nei prolungamenti si trovano di preferenza filamenti più lunghi.

Quale rapporto sussiste fra filamenti e granulazioni?

Il rispondere a tale quesito è più difficile di quanto possa sembrare a prima vista; anche quando fissiamo la nostra attenzione sovra un'unica cellula per parecchio tempo, i mutamenti nella sede e nella forma degli organuli in essa contenuti sono così rapidi, che il seguire il destino di ciascuno di essi è cosa veramente ardua.

Dapprima propendevo per ritenere che non esistesse un rapporto genetico fra filamenti e granuli; e questa mia convinzione si fondava sul fatto che i condrioconti son sempre lisci; mai ho notato forme a rosario, le quali lascino supporre una frammentazione lineare dei filamenti.

Piuttosto mi è sembrato che talora dall'estremità di un filamerto si distaccassero dei minuti granuli; e più sovente che dei corti filamenti divenissero gradatamente più tozzi e si trasformassero in granulazioni; e queste alla lor volta ripercorrevano talora il cammino fatto e ridivenivano filamentosi.

A definire il significato dei granuli ha validamente contribuito qualche osservazione da me eseguita su colture colorate *intra vitam;* e fra le varie colorazioni vitali ho preferito quella col Bleu Pirrolo; è noto che le ricerche di E. GOLDMANN hanno dimostrata la scarsa tossicità di questo colore; e del resto la colorazione vitale delle colture col Pirrolo era stata già sperimentata da HOFFMANN.

La soluzione di Bleu Pirrolo in liquido di RINGER fu aggiunta al plasma in varia concentrazione; 3-4 goccie di soluzione 0,5% a due cm^3 di plasma non danneggiano affatto la vitalità della coltura.

Già in colture di 24 ore si osserva una colorazione vitale di molte cellule. A forti ingrandimenti e con illuminazione opportuna, si distinguono gli stessi lunghi condrioconti che furono descritti più sopra, colorati debolmente in azzurro chiaro, che risaltano sulla parte omogenea dei protoplasma, la quale è del tutto scolorata. In prossimità del nucleo sono accumulate in gran numero granulazioni e tozzi bastoncini colorati con grande intensità in azzurro; però, sebbene essi siano localizzati prevalentemente in quella sede, un certo numero si spinge in altre parti della cellula e perfino nella parte più distale dei prolungamenti.

Studiando pazientemente le colture colorite mantenute alla temperatura di 39° vediamo non di rado i filamenti sottili diventare più tozzi e più corti, ed allora l' intensità della loro colorazione aumenta moltissimo; possiamo così assistere sotto il microscopio alla trasformazione dei sottili filamenti in granulazioni grossolane. E questo semplice fatto convalida quanto ho già supposto, che gli uni e gli altri rappresentino formazioni della stessa natura, siano cioè da ascriversi al condrioma.

È probabile che la maggior intensità nella colorazione dei suddetti

organuli dipenda da un riavvicinamento delle molecole coloranti contenute (secondo la teoria fisica della colorazione) negli spazî intermicellari della cellula; e tale ravvicinamento sarebbe in dipendenza del cambiamento nello stato fisico dei condriosomi, indicato nei preparati non colorati da una maggiore refrangenza (1).

Quale valore abbia questo mutamento non mi fu dato finora di stabilire, ma insisto sovra un carattere che ritengo importante ed al quale ho più sopra accennato, quello della reversibilità della loro forma.

I fenomeni da me osservati trovano il loro riscontro in quelli illustrati da PENSA (2) nel condrioma di cellule epidermiche di giovani fogliolìne di rosa viventi; filamenti anastomizzati a rete si trasformano in una massa spugnosa, per poi riacquistare la forma di filamenti; si trattava anche in questo caso di fenomeni reversibili. Ed il PENSA esprime il convincimento, fondato sulle sue osservazioni in elementi cartilaginei, che anche il condrioma delle cellule animali sia qualche cosa di instabile nella forma e disposizione.

Gli organuli cellulari fin qui descritti non sono certo i soli che io abbia osservati nelle cellule coltivate in vitro. Spesso ho notata la scomparsa di goccioline di grasso e queste potevano essere tanto numerose e grandi che il corpo cellulare ne era completamente riempito. Non rara era pure la comparsa di granulazioni di natura proteica.

Queste sostanze metaplasmatiche si distinguevano facilmente dai condriosomi, oltre che per il maggior volume, per la più spiccata refrangenza; esse si differenziavano di preferenza in colture di qualche giorno di vita e la loro comparsa preludeva sovente a gravi alterazioni della cellula. Però una piccola quantità di grasso è compatibile anche in questi elementi colla vitalità della cellula, ed anzi ho spesso visto, tanto in colture viventi che fissate, cellule in mitosi contenenti abbondante grasso.

Se il condrioma abbia o no una parte nell'elaborazione di queste sostanze tralascio per il momento di discutere.

(1) La colorazione vitale delle colture è certamente un ottimo mezzo di indagine; però non accetterei senza qualche riserva le imagini ottenute con questo metodo come l'esponente di strutture normali. Infatti nelle cellule colorate il condrioma granulare, il quale è situato presso il nucleo ed è intensamente colorato, prevale su quello a forma di filamenti, mentre nelle colture non colorate si nota l'opposto, ed anzi i granuli spesso mancano del tutto.

Ciò farebbe supporre che la colorazione vitale non sia del tutto indifferente per il condrioma, e che una parte di questo subisca nell' impregnarsi di colore un mutamento di forma.

(2) PENSA A. Condriosomi e pigmento autocianico nelle cellule e vegetali. *Anat. Anz.*, XLV, 1913.



Fig. 2. - Cellula da una coltura (O_1) del mesenchima della testa di un embrione di pollo al 4° giorno, fissata alla 57ª ora in liquido di Maximow. Colorazione diretta della coltura in ematossilina ferrica. Ingr. 1300.

Lo studio di queste stesse colture dopo fissazione e colorazione ha dimostrato colla maggiore evidenza, che gli organuli citoplasmatici studiati nel vivente hanno la forma e le affinità tintoriali dei condrioconti; la coincidenza fra i risultati delle osservazioni sulle cellule viventi e quelli sui preparati fissati è, almeno da tale punto di vista, perfetta. (Vedi fig. 1, 2).

Interessante riescì lo studio della divisione indiretta negli elementi delle colture. Elementi in mitosi in numero grandissimo si osservano in tutte le colture, specialmente se il plasma fu diluito in liquido di RINGER, poichè, come fu dimostrato da BURROW, la diluizione del mezzo favorisce l'accrescimento.

Resultati anche più favorevoli, da tale punto di vista si ottengono col metodo di CARREL di attivare la coltura coll'aggiunta di una piccola quantità di estratto di embrioni di pollo. Le mitosi di cellule viventi da me accuratamente esaminate sommano a parecchie centinaia.

Trascurando di riferire le caratteristiche del processo mitotico nelle cellule della coltura, riferirò soltanto quello che ha più stretta attinenza col nostro argomento, sulla costituzione del citoplasma.

Il seguire la trasformazione della cellula dallo stato di riposo all' inizio della profase è molto difficile; però in qualche raro caso anche questo fu possibile.

Contemporaneamente alla scomparsa della membrana nucleare ed al divenire manifesti i cromosomi, ho notato che i condrioconti si raccorciavano, divenivano più tozzi e sopratutto si addensavano, diminuendo la parte fondamentale omogenea del citoplasma. Nella fase di monaster il citoplasma appare di gran lunga più refrangente che nelle cellule in riposo e questo dipende evidentemente dall'addensamento del condrioma. E tale circostanza ne rende ardua l'analisi; è fuor di dubbio che spesso durante tutta la mitosi i condrioconti si accorciano, divengono più tozzi e forse anche si frammentano in granuli; ma in molte cellule ho notata la permanenza di filamenti con caratteri fisici simili a quelli delle cellule in riposo, per quanto sempre più brevi. Granuli e filamenti sono in continuo movimento.

In mitosi molto appiattite ho talora osservati lunghi filamenti identici a quelli della cellula in riposo.

Durante il 2° periodo della metafase e nell'anafase i condriosomi si dispongono ai lati del fuso e non invadono mai la regione occupata da quest'ultimo; la legge dell' impenetrabilità del fuso, già enunciata da altri autori che hanno studiato il comportamento del condrioma nella mitosi, risulta confermata. Molto istruttive per lo studio del condrioma nella mitosi riescono le colture colorite col bleu Pirrolo; nel primo periodo della

metafase vediamo granuli e corti bastoncini coloriti intensamente in azzurro disseminati irregolarmente nel citoplasma; non appena incomincia lo strozzamento del citoplasma accorrono in buon numero verso il piano equatoriale e subito dopo lo abbandonano; contemporaneamente nuovi condriosomi si portano in quella regione sino a telofase inoltrata, quando le due cellule sono unite da un sottile ponte protoplasmatico, nel quale si riconosce il residuo fusoriale. La presenza dei condriosomi nel piano equatoriale è tanto fugace, che, nonostante la grande rapidità con cui avviene lo strozzamento del citoplasma, una parte del condrioma si trova sempre a distanza da quella regione.

Se proprio ciascun condriosoma si divida durante la mitosi, è difficile, ed anzi impossibile per le forme granulari, di definire. Certamente verso la fine della telofase molti granuli si distribuiscono a parti eguali nelle due cellule figlie, senza che al piano equatoriale sia apprezzabile la loro divisione; forse questa avviene in altre parti della cellula ed in tal caso il fenomeno tanto caratteristico dell'accorrere dei condriosomi al piano equatoriale è diretto a regolare la distribuzione dei condriosomi nelle due cellule figlie.

In qualche caso in cui le due cellule figlie erano di grandezza diversa, la repartizione dei condriosomi avveniva in misura ineguale.

La mitosi delle cellule coltivate in vitro è caratterizzata da un vivace ameboidismo, fenomeno che era stato già notato da LAMBERT.

Durante tutte le fasi del processo di divisione, ma con frequenza assai maggiore all' inizio della divisione del citoplasma, la superficie della cellula diviene irregolarissima in seguito all'apparizione di numerose e grosse gemme sferiche od emisferiche, (e nel primo caso congiunte alla cellula da un sottile peduncolo) le quali sono emesse con sorprendente rapidità e non meno rapidamente vengono riassimilate. Il fenomeno è tanto più fugace, quanto più veloce è la divisione del citoplasma; la durata di quest'ultime dipende da varî fattori, ma sopratutto dalla temperatura.

Le gemme in qualche raro caso hanno la stessa costituzione della parte principale del corpo cellulare; ma più spesso sono trasparenti, a costituzione omogenea e risaltano appunto per questi caratteri sul protoplasma molto refrangente della cellula in mitosi. Sembra adunque che durante la telofase avvenga una separazione transitoria fra la parte liquida del citoplasma, la quale costituisce queste gemme ameboidi ed il condrioma, che resta addensato nel rimanente del corpo cellulare.

Le mie ricerche dimostrano adunque:

1. Che la parte fondamentale del citoplasma è un colloide liquido

— un sol — senza struttura veruna, nel quale sono sospesi degli organuli dotati di proprietà fisiche ben definite ed otticamente differenziabili dalla prima, i condriosomi.

2. I condriosomi cambiano continuamente di sede e di forma, anche indipendentemente dai movimenti ameboidi della cellula; più sensibile è il mutamento di forma del condrioma nella mitosi; e durante questo processo la parte fondamentale liquida del citoplasma diminuisce, forse per perdita d'acqua.

3. I cambiamenti nella forma del condrioma sono sempre reversibili.

4. Che le strutture — filare od alveolare — le quali furono ritenute un attributo costante del protoplasma vivente hanno il valore di differenziazioni funzionali, dato che esse mancano nelle cellule embrionali sdifferenziate, quali son quelle da me studiate; perchè tenendo conto dei caratteri dei condriosomi — mobilità e grande mutabilità di forma — non possiamo certo considerarli come l'esponente della struttura filare del protoplasma, come vuole Meves.

Soltanto dopo che le presenti ricerche erano state condotte a termine, ebbi notizia della memoria di M. R. e W. H. Lewis (1) nella quale sono riferite osservazioni analoghe alle mie, pure eseguite su cellule viventi coltivate in vitro, in liquido di Locke, anzichè in plasma sanguigno.

La conferma che le mie osservazioni portano a quelle di M. R. e W. H. Lewis viene ad acquistare un maggior valore per la circostanza che i nostri studî furono condotti indipendentemente gli uni dagli altri, e per questo ho creduto non inutile il renderle di pubblica ragione.

(1) M. R. e W. H. Lewis. Mitochondria and other cytoplasmic structures in tissue-cultures. *Amer. Journ.* of *Anatomy*, XVII, 1915.
